

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory, bakalářské

Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Schneiderová

Aplikace cíleně modifikovaných enzymů při výrobě β -laktamových antibiotik
Application of tailor-made enzymes for biosynthesis of beta-lactam antibiotics

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce / Školitel:

RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Odborný konzultant:

RNDr. Václav Štěpánek, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.05.2012

Podpis:

Schneiderová Michaela

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli panu RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc., za možnost vypracovat bakalářskou práci v jeho laboratoři, jakož i za pomoc při jejím psaní. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. za cenné rady a obětavou pomoc při psaní práce. V neposlední řadě děkuji Mgr. Michalu Grulichovi a Mgr. Martině Plačkové za rady a morální podporu, jakož i celému kolektivu Laboratoře enzymových technologií Mikrobiologického ústavu, v.v.i AV ČR.

Na závěr moc děkuji svým rodičům, za podporu a péči, jež provázely celé mé dosavadní studium.

Abstrakt

β -laktamová antibiotika jsou v dnešní době široce využívána jako bakteriostatické látky. Chemickou výrobu antibiotik nebo jejich derivátů může nahradit biokatalýza. Tato práce pojednává o základech průmyslové přípravy β -laktamových antibiotik a hlavně o enzymech, jež se ve výrobě používají. Seznamuje s tím, jak byly enzymy modifikovány a vylepšeny, aby co nejvíce vyhovovaly požadavkům průmyslové výroby.

Klíčová slova: 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, AEH, cefalosporin, cefalosporinacylase, penicilin, penicilinacylase

Abstract

Nowadays β -lactam antibiotics are widely used as bacteriostatic agents. The chemical synthesis of antibiotics or its derivatives could be replaced with biocatalysis. This work deals with basics of industrial synthesis β -lactam antibiotics and, mainly, with used enzymes. This work acquainted with methodes used in enzyme modifications and improving, so they could fit the best for the industrial syntheses.

Key words: 6-APA, 7-ACA, 7-ADCA, AEH, cephalosporin, cephalosporin acylase, penicillin, penicillin acylase

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	10
1. Přírodní“ beta-laktamová antibiotika	11
1.1 Peniciliny	11
1.2 Cefalosporiny	12
1.3 Rezistence	12
2.4 Biosyntézy β -laktamů	13
2. Výroba beta-laktamů	15
2.1 Výroba 6-APA	16
2.1.1 Chemická výroba.....	16
2.1.2 Enzymatická výroba	16
2.2 Výroba 7-ADCA.....	17
2.2.1 Chemická výroba.....	17
2.2.2 Enzymatická výroba	17
2.3 Výroba 7-ACA.....	18
2.3.1 Chemická výroba.....	18
2.3.2 Enzymatická výroba	18
2.3 Enzymatická syntéza antibiotik	19
2.3.1 Termodynamicky řízená syntéza.....	20
2.3.2 Kineticky řízená syntéza	21
3. Enzymy účastnící se výroby β-laktamových antibiotik	21
3.1 Penicilinacylasy	22
3.1.1 Penicilin-V-acylasy	22
3.1.2 Penicilin-G-acylasy	22
3.1.3 Ampicilinamidasy	23

3.2 Esterasy α -aminokyselin (AEH)	23
3.3 Cefalosporinacylasy	24
3.4 Oxidasy D-aminokyselin	25
4. Vylepšování enzymů transformujících β-laktamová antibiotika	25
4.1 Penicilinacylasy	26
4.2 Esterasy α -aminokyselin	27
4.3 Glutarylacylasy	27
Závěr	28
Seznam citací	29

Seznam zkratek

6-APA	Kyselina 6-aminopenicilanová
7-ACA	Kyselina 7-aminocefalosporanová
7-ADCA	Kyselina 7-aminodeoxycefalosporanová
αArg145	Arginin v pozici 145 na α podjednotce
ACVS	Aminoadipyl-cysteinyl-valinylsyntetasa
AEH	Esterasa α -aminokyselin
Ala	Alanin
ApA	Ampicilinamidasa
Asn266	Asparagin v pozici 266
Asp	Kyselina asparagová
ATP	Adenintrifosfát
CA	Cefalosporinacylasa
CLEA	Cross-linkované enzymové agregáty
CLEC	Cross-linkované enzymové krystaly
CO₂	Oxid uhličitý
COOH skupina	Karboxylová skupina
DAAO	Oxidasy D-aminokyselin
DAC	Deacetylcefalosporin C
DACS	Deacetylcefalosporin-C-syntasa
DAOC	Deacetoxycefalosporin C
DAOCS	Deacetoxycefalosporin-C-syntasa
Phe146	Fenylalanin v pozici 146
Fe²⁺	Kationt železa (dvojmocný)
GA	Glutarylacylasa
His	Histidin
IB	Inkluzní tělíska
kDa	kiloDalton
LLD-ACV	δ -(L- α -aminoadipyl)L-cysteinyl-D-valin
Mg²⁺	Hořčnatý kationt
Ntn	N-koncový nukleofil
PA	Penicilinacylasa

PAA	Kyselina fenyloctová
PGA	Penicilin-G-acylasa
PMSF	Fenylmetylsulfonyl fluorid
PVA	Penicilin-V-acylasa
Arg145	Arginin v pozici 145
S/H poměr	Poměr syntéza/hydrolýza
Ser	Serin
Serβ1	Serin v pozici 1 na β podjednotce
sp.	species
Tyr²⁰⁶	Tyrozín v pozici 206
UV	Ultrafialové světlo

Úvod

Objev antibiotik, mezi něž patří i antibiotika β -laktamová, s sebou přinesl převrat v dějinách medicíny. Díky těmto látkám totiž můžeme léčit nemoci, na něž dříve lidé velmi často umírali. Antibiotika nehrají roli pouze při vlastní léčbě onemocnění, ale používají se také jako profylaxe při poranění, po operacích apod. Díky antibiotikům se stal náš život pohodlnější, bezpečnější a také delší, než tomu bylo dříve.

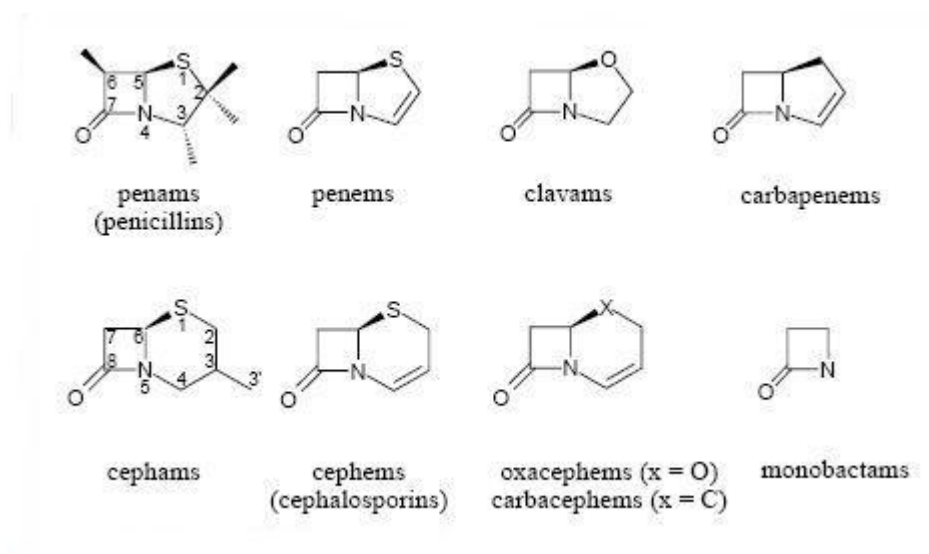
Pro masové používání antibiotik, jaké probíhá v současné době, bylo nezbytné zavést jejich průmyslovou výrobu. V první řadě je samozřejmě možné antibiotika získávat kultivací organismů, jež je produkují. Nevýhodou tohoto způsobu výroby je, že vzniká stále stejná látka, na niž si patogenní (mikro)organismy rychle a snadno vytvářejí rezistenci. Nejrychlejší vznik rezistence je v tomto směru zaznamenán u bakterií *Staphylococcus aureus* (Jovetic et al., 2010). V rámci boje proti této rezistenci byla vyvinuta semi-syntetická β -laktamová antibiotika, která můžeme měnit tak, aby je bakterie nerozeznávaly. Při jejich průmyslové výrobě jsou využívány poznatky, jež byly získány podrobným zkoumáním biosyntetických drah u původních producentů.

Jelikož výroba semi-syntetických β -laktamových antibiotik nemůže probíhat přirozenou cestou, byly navrženy způsoby chemické výroby. Čím však narůstá spotřeba antibiotik, tím větší problém dělá nejen ekonomická, ale i ekologická náročnost této farmaceutické výroby. Naštěstí byly navrženy způsoby, jak průmyslově vyrábět antibiotika pomocí enzymů, tak zvanou biokatalýzou, která není tak nebezpečná pro životní prostředí a zároveň je po svém zavedení i levnější a jednodušší.

Enzymy, které se podílejí na biotransformační výrobě β -laktamů, byly původně izolovány z mikroorganismů, avšak postupem času se začaly využívat enzymy modifikované. Zpočátku docházelo k mutacím pomocí náhodné mutageneze, později, a to díky rozvoji molekulárně-biologických technik, bylo možné odpovídající geny mutagenizovat řízeně, přičemž spektrum metod jak v konečném důsledku vylepšit vlastnosti genových produktů se stále rozšiřuje.

1. „Přírodní“ β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika, též β -laktamy, jsou dnes nejčastěji používané bakteriostatické látky (Novak, 2006). Účinek těchto látek se projevuje pouze na rostoucích buňkách s buněčnou stěnou, protože β -laktamy se váží na penicilin vazebné proteiny, které se účastní syntézy a remodelace peptidoglykanu (Denome et al., 1999). β -laktamy jsou sekundární metabolity různých organismů, přičemž poprvé byly objeveny u hub rodu *Penicillium*, které vylučováním těchto látek reagovaly na stres. Podle struktury jádra antibiotika, které má bakteriostatickou aktivitu, můžeme dělit β -laktamy na penamy, penemy, cefamy, cefemy, klavamy, karpenemy, oxacefemy, karbacefemy a monobaktamy (Obr. 1). Pro první 4 výše zmíněné typy je charakteristická přítomnost síry v heterocyklu. Jádra β -laktamů jsou velice nestabilní, proto trvalo dlouho, než se podařilo izolovat čistou formu prvního z β -laktamových antibiotik, penicilinu (Florey, 1939).



Obr. 1: Jádra různých β -laktamových antibiotik (Andersson et al., 2001).

1.1 Peniciliny

V této práci bych se chtěla soustředit hlavně na peniciliny a cefalosporiny. Termín penicilin je odvozen od plísně rodu *Penicillium*, u které byla poprvé pozorována produkce látky, která zabraňuje růstu bakterií. Alexander Fleming popsal svůj objev v článku pro *British Journal of Experimental Pathology* roku 1929 (Allison, 1956). Jádro penicilinů je tvořeno β -laktamovým kruhem, který je cílovou strukturou pro činnost β -laktamas, spojeným s thiazolidinovým heterocyklem, v němž je přítomen

dušík a síra (Crowfoot, 1948). Mezi přirozené peniciliny patří penicilin V (Martin et al., 1955), G, K, F a X (Craig et al., 1947).

1.2 Cefalosporiny

Produkci cefalosporinů tvořících další ze skupin β -laktamových antibiotik, poprvé pozoroval roku 1953 Giuseppe Brotzu u houby rodu *Cephalosporium* (Abraham et al., 1955). Přestože má cefalosporin C nízkou bakteriostatickou aktivitu, jeho hlavní výhodou bylo, že byl účinný jak na gram-pozitivní, tak i na gram-negativní bakterie (Weil et al., 1995). Později byly popsány i jiné druhy organismů, které produkují cefalosporiny nebo další přírodní β -laktamy s obdobným „cefalosporinovým“ jádrem (cefamyciny, cefabaciny, chitinovoriny), které je odvozeno od kyseliny adipové, valinu a cysteinu. Z hub je to výše zmíněné *Cephalosporium acremonium* (syn. *Acremonium chrysogenum*) a *Paecilomyces persinicus*, z gram-pozitivních bakterií *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* a gram-negativních *Flavobacterium* sp. nebo *Lysobacter lactamgenus* (Elander, 1983).

1.3 Rezistence

Užití antibiotik je omezeno tím, že bakterie vůči nim mohou být rezistentní. Rezistence může být způsobená různými mechanismy. Bakterie mohou snížit transport antibiotika do buněk, aktivně jej vylučovat z buňky, enzymaticky antibiotikum štěpit, zneškodnit navázáním peptidu, obejít dráhu, kterou antibiotikum blokuje, vázat na antibiotikum specifický imunitní protein nebo nadprodukcí cílové struktury antibiotikum vytitrovat (Hayes and Wolf, 1990).

Rezistence k β -laktamovým antibiotikům je nejčastěji zapříčiněna produkcí specifických enzymů, které dokážou štěpit β -laktamové jádro. Tyto enzymy se nazývají β -laktamasy a byly poprvé popsány ještě před uvedením penicilinu do praxe. Abraham a Chain totiž z roce 1940 zjistili, že ruší bakteriostatický účinek β -laktamů, a dokonce také předpověděli, že mohou způsobovat problémy při používání β -laktamových antibiotik, ovšem nedokázali odhadnout jejich budoucí rozsah. Masové užívání antibiotik a další tehdy ještě neznámé způsoby získávání rezistence rapidně zrychlilo šíření rezistence mezi bakteriemi. Nejrozšířenější způsob předávání rezistence je pomocí tzv. R (rezistentního) plazmidu, dalšími možnostmi jsou spontánní mutace, mezidruhová výměna, výměna pomocí transponovatelných elementů (Davies, 1994). U β -laktamas hraje velkou roli mutace, přičemž jediná bodová mutace může zásadně změnit substrát, který enzym rozeznává. Tím se rozšiřuje spektrum látek, na které může

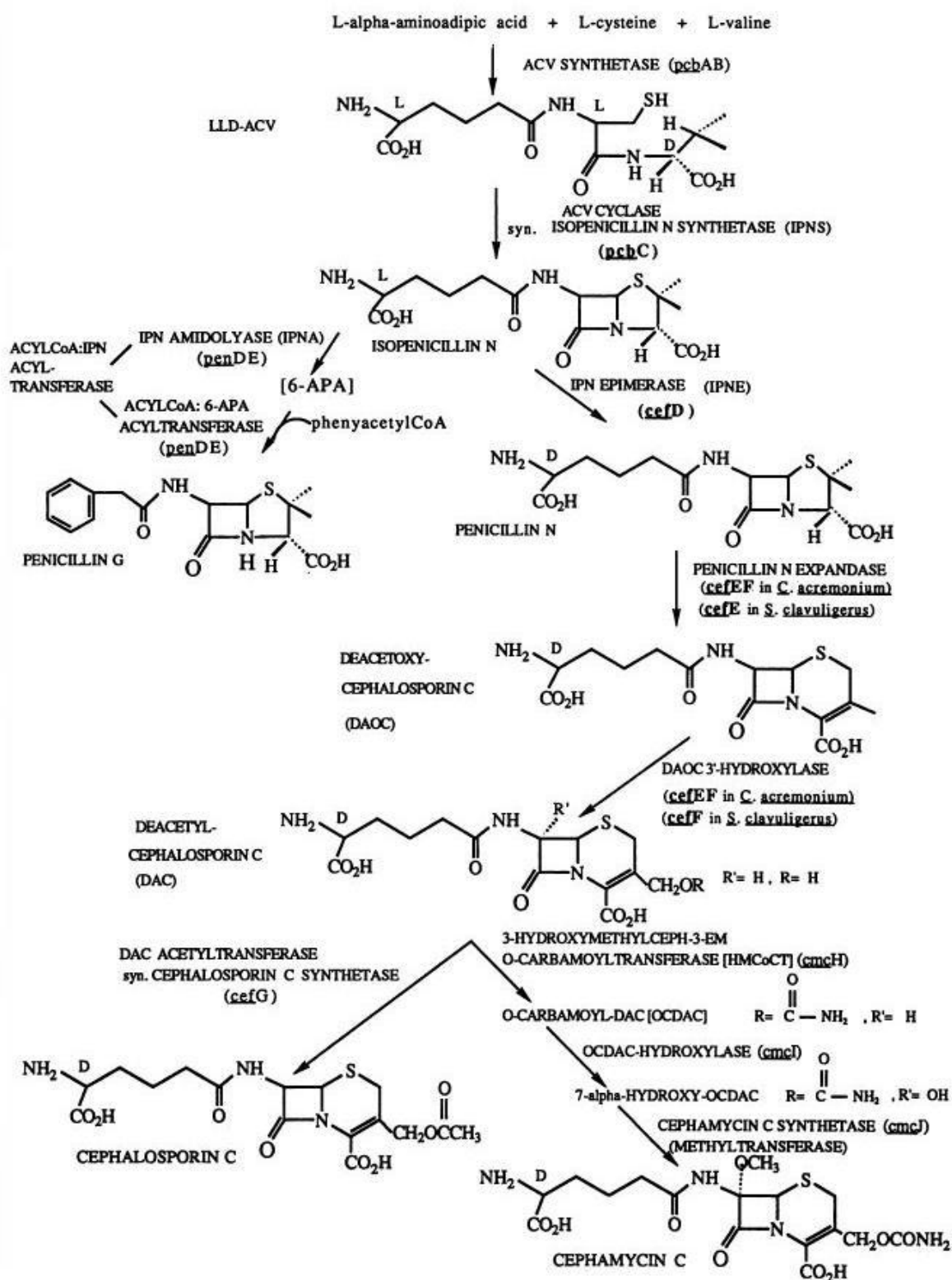
být bakterie rezistentní (Jacoby and Medeiros, 1991). Rezistenci na antibiotikum enzymy zajišťují rozštěpením β -laktamového jádra. Některé druhy β -laktamas používají ionty zinku k naštěpení jádra, ale většina jej nevyžaduje. Vazba, kterou štěpí, je mezi dusíkem a uhlíkem, na který se váže kyslík (Livermore, 1995).

Lidé bojují s rozšiřující se tolerancí k antibiotikům vývojem nových semi-syntetických antibiotik a pomocí aditiv, které inhibují β -laktamasu (např. amoxicilin a kyselina klavulanová; Ball et al., 1997). Bakterie se naopak brání tvorbou mutantních β -laktamas, které jsou rezistentní k danému inhibitoru a účinkují na antibiotikum. Tento boj je pravděpodobně nekonečný.

1.4 Biosyntézy β -laktamů

Biosyntetická dráha penicilinů a cefalosporinů je na začátku shodná (obr. 2). První reakcí je kondenzace kyseliny L- α -aminoadipové a L-cysteinu a D-valinu na δ -(L- α -aminoadipyl)L-cysteinyl-D-valin, (LLD-ACV). Tuto reakci katalyzuje aminoadipyl-cysteinyl-valinylsyntetasa (ACVS) (Zhang and Demain, 1990a; Zhang and Demain, 1990b). ACVS je poměrně velký cytosolický enzym, který pro reakci vyžaduje přítomnost Mg^{2+} kationtů a ATP (Zhang et al., 1992). Díky enzymu isopenicilin-N-syntetasa dojde k cyklizaci LLD-ACV za vzniku isopenicilinu N (Kupka et al., 1983). Isopenicilin N je dále pomocí epimerasy přesmyknut na penicilin N. (Lubbe et al., 1986)

Při syntéze cefalosporinů dochází k expanzi jádra penicilinu N na deacetoxycefalosporin C (DAOC) pomocí deacetoxycefalosporin-C-syntasy (DAOCS), za přítomnosti Fe^{2+} , kyslíku, kyseliny L-askorbové a α -ketoglutarátu. DAOCS nevyžaduje ATP, ale jeho přítomnost stimuluje aktivitu syntasy. Následnou reakci, hydroxylaci deacetoxycefalosporinu C na deacetylcefalosporin C (DAC), katalyzuje enzym deacetylcefalosporin-C-syntasa (DACS), která potřebuje stejné kofaktory. Zatímco enzymy DAOCS a DACS jsou u prokaryot kódovány dvěma homologními strukturními geny (Jensen et al., 1985), u hub obě tyto reakce zajišťuje pouze jeden bifunkční enzym DAOC/DAC-syntasa (Kupka et al., 1983). Z deacetylcefalosporinu C následně vznikne cefalosporin C reakcí acetyltransferasy, a to za účasti acetylkoenzymu A jako kofaktoru (Baldwin et al., 1992).



Obr 2: Biosyntetická dráha penicilinu G a cefalosporinu C (Queener, 1990).

2. Výroba β -laktamů

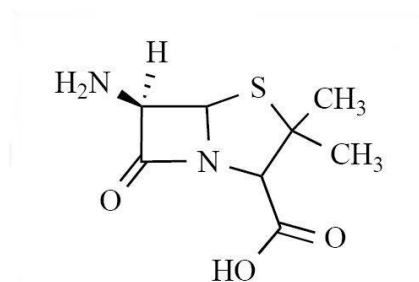
Výroba β -laktamových antibiotik prodělala v posledních šedesáti letech rychlý vývoj. Z původní chemické se v současné době přechází na ekonomičtější, výhodnější a čistší výrobu enzymatickou. Jelikož si mnohé druhy bakterií vytvořily rezistenci na přírodní β -laktamy, ve většině případů je nelze nadále používat. Naštěstí bylo objeveno, že je možné použít jádro penicilinu, připojit jiné postranní řetězce a tím vytvořit novou látku. Jádro penicilinů bez postranních řetězců tvoří 6-aminopenicilanová kyselina (6-APA) vznikající hydrolýzou přírodních penicilinů, hlavně penicilinu G (Rolinson et al., 1960). Modifikované postranní řetězce se k ní připojují acylací z tzv. acyldonoru, takže se 6-APA stala základním substrátem pro výrobu semi-syntetických penicilinů (Cole, 1969). Významná antibiotika odvozená od penicilinu G jsou například ampicilin a amoxicilin. Expanzí 6-APA vzniká kyselina 7-aminodeacetoxycefalosporanová (7-ADCA), která slouží k syntéze některých semi-syntetických cefalosporinů (cefalexin, cefadroxil). Další se vyrábějí přímo z kyseliny 7-aminocefalosporanové (7-ACA), jež se připravuje hydrolýzou cefalosporinu C (Elander, 2003).

Dříve probíhala výroba β -laktamových antibiotik chemickou cestou, pouze penicilin G byl získáván fermentací houby druhu *Penicillium chrysogenum* (Herschbach et al. 1984). Klasická metoda výroby ostatních antibiotik pomocí organické chemie ovšem vyžadovala použití řady nebezpečných velmi reaktivních látek, byla náročná na spotřebu energie a produkovala obrovské množství odpadu na hmotnost vyrobeného produktu. Například u široce rozšířeného cefalexinu, kterého se v roce 2000 vyrobilo téměř 3 000 tun, to je 30–40 kg odpadu na 1 kg antibiotika (de Souza et al., 2005). Reakce probíhaly v nepřírodných podmínkách, jako je nízká teplota (méně než -30°C), používala se organo-chloridová rozpouštědla a bylo nezbytné chránit nebo naopak odkrývat vedlejší skupiny, čímž se proces prodloužil a zkomplikoval (Ospina et al., 1996). V dnešní době se vědci snaží optimalizovat enzymatickou výrobu antibiotik natolik, aby nahradila chemickou. Průmyslová produkce tak může probíhat pomocí biokatalýzy či biotransformace. Potenciálně využitelné enzymy jsou intenzivně zkoumány a před použitím v průmyslové výrobě navíc výhodně modifikovány, aby se zvýšila jejich účinnost a stabilita.

K výrobě se používají jak samotné enzymy izolované z mikroorganismů, tak i celé produkční organismy. Velká výhoda enzymové výroby je její nenáročnost a ekologičnost. Probíhá v přirozených podmínkách ze snadno dostupných substrátů

a nevzniká toxický odpad. Stabilizované enzymy lze používat opakovaně a zároveň využít jejich stereoselektivity: využívají pouze jeden z možných stereoizomerů a produkují také pouze jeden typ. Tato vlastnost je důležitá, protože chemická výroba produkuje oba možné stereoizomery a ty se pak musí velmi obtížně od sebe izolovat, protože obvykle pouze jeden z nich má požadovanou biologickou aktivitu (Sheldon and Downing, 1999). Enzymatická výroba má však i své nevýhody - proti širokému zavedení v průmyslu je např. míra výnosu optimalizovaného procesu chemické výroby.

2.1 Výroba 6-APA



Obr.3: Kyselina 6-aminopenicilanová (Volpato et al., 2010).

2.1.1 Chemická výroba

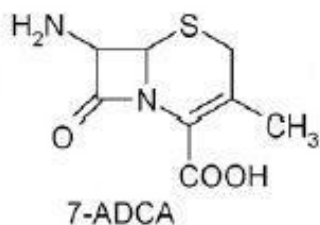
Proces chemické výroby 6-APA probíhá metodou „Delft Cleavage“, což je deacylace penicilinu G, při níž dochází k přerušení sekundární amidové vazby pomocí transformace na iminochlorid použitím chloridu fosforečného v dichlormetanu. Iminochlorid je vzápětí pomocí alkoholu převeden na iminoeter. Následuje hydrolýza na ester-6-APA, přičemž karboxylová skupina je během celého procesu chráněna vazbou na trimetylsilyl, po jehož odštěpení vzniká 6-APA. Ačkoliv reakce probíhá za velmi nízké teploty a nebezpečné chemikálie je složité přechistit pro opětovné použití, přesto byla pravděpodobně nejvíce používanou metodou, protože je poměrně levná (Weissenburger and van der Hoeven, 1970).

2.1.2 Enzymová výroba

„Delft Cleavage“ byla používána ještě 15-20 let poté, co byl v šedesátých letech minulého století objeven nový způsob výroby pomocí enzymů. Při této biokatalýze docházelo k enzymatické deacylaci penicilinu G pomocí penicilin-G-acylasy (PGA) (Rolinson et al., 1960). Avšak biokatalýza v této době ještě nebyla optimalizována a měla nízkou výtěžnost na to, aby se zavedla do praxe. Přesto docházelo k intenzivnímu zkoumání účastnících se enzymů. Byly objeveny mimo jiné

stabilnější penicilin-G-acylasy a další způsoby, jak ovlivnit reakce ve prospěch produkce antibiotik. V dnešní době probíhá enzymová výroba 6-APA převážně pomocí imobilizovaných penicilinacylas, které štěpí penicilin G nebo penicilin V za vzniku 6-APA a příslušného derivátu octové kyseliny, které, bohužel, působí inhibičně na enzym, tudíž je nutné modifikovat reakční podmínky tak, aby k inhibici docházelo co nejméně (Alkema et al., 1999). Jelikož imobilizace PGA umožnila recyklaci enzymu (Harrison and Gibson, 1984), převážily již výhody natolik, že enzymová výroba z velké části nahrazuje chemickou (van Langen et al., 1999).

2.2 Výroba 7-ADCA



Obr. 4: Kyselina 7-aminodeacetoxycefalosporanová (Chandel et al., 2008).

2.2.1 Chemická výroba

7-ADCA vzniká z deacetoxycefalosporinu C. Hydrolýza této molekuly bohužel nemohla být použita, protože není dosud objeven žádný produkční kmen, který by ji poskytoval v dostatečném množství. V 60. letech 20. století však objevili Morin a spol., že jádro penicilinů může expandovat a vytvořit jádro deacetoxycefalosporinu C. Reakce, kterou navrhli, probíhala sulfoxidací, esterifikací a následně dehydratací spojenou s expanzí 6-APA za vzniku 7-deacetoxycefalosporanové kyseliny (7-ADCA) (Morin et al., 1963). Později se na výrobu 7-ADCA používaly jiné postupy, které sice vycházely z této metody, ale dosahovaly mnohem vyšších výtěžků. Příkladem takovéto výroby je reakce sulfidu penicilinu G s bromidem pyridinu a poté s N,N'-bis-trimetylsilyl-močovinou v toluenu s výtěžností přes 80% (Bunnell et al., 1986).

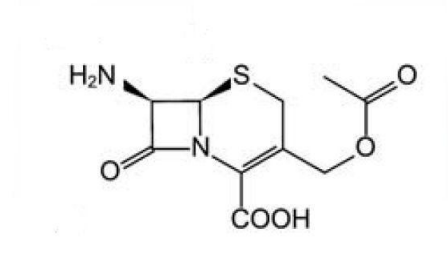
2.2.2 Enzymatická výroba

Snahou bylo zrušit dvoukrokovou chemickou výrobu 7-ADCA a nahradit ji výrobou enzymatickou, přičemž největší problém činila expanze pětičlenného heterocyklu penicilinů na šestičlenný. V biosyntéze je tento krok katalyzován enzymem

deacetoxycefalosporin-C-expandasou. Substrátem pro expandasu je striktně penicilin N, který však není komerčně dostupný a rozšířit jeho substrátovou specifitu i pro jiné peniciliny či 6-APA se nepodařilo ani genetickými modifikacemi (Cantwell et al., 1990). Tento problém vyřešil teprve přenos genů pro izopenicilin-N-epimerasu a penicilin-N-expandasu ze *Streptomyces clavuligerus* do plísně *Penicillium chrysogenum*. Po transformaci plíseň v průběhu fermentace produkovala deaceoxycefalosporin C (Cantwell et al., 1992).

Crawford a jeho spolupracovníci využili již známou informaci, že *P. chrysogenum* při fermentaci s kyselinou adipovou produkuje adipyl-6-APA (Ballio et al., 1960) a použili tuto kyselinu jako substrát pro fermentaci rekombinantní plísně *P. chrysogenum*. Výsledkem byla syntéza adipyl-7-ADCA, z níž se 7-ADCA snadno získá pomocí glutarylacylasy (Schroen et al., 2000).

2.3 Výroba 7-ACA



Obr. 5: Kyselina 7-aminocefalosporanová (Barber et al., 2004).

2.3.1 Chemická výroba

Kyselina 7-aminocefalosporanová (7-ACA) vzniká hydrolýzou cefalosporinu C. Při chemické výrobě je nejdříve nezbytné ochránit amino- a karboxylovou skupinu na cefalosporinu C, které nechceme štěpit. Děje se tak nejčastěji pomocí trimetylsilylu. Poté je k cefalosporinu C přidán chlorid fosforečný, díky kterému vzniká iminochlorid. Ten v dalším kroku reaguje s alkoholem za vzniku iminoeteru, který se hydrolyzuje kyselinou na ester-7-ACA, z něhož po odstranění trimetylsilylu chránícího funkční skupiny vzniká čistá 7-ACA (Fechtig et al., 1968, Bede 1969, Cauvete 1969).

2.3.2 Enzymová výroba

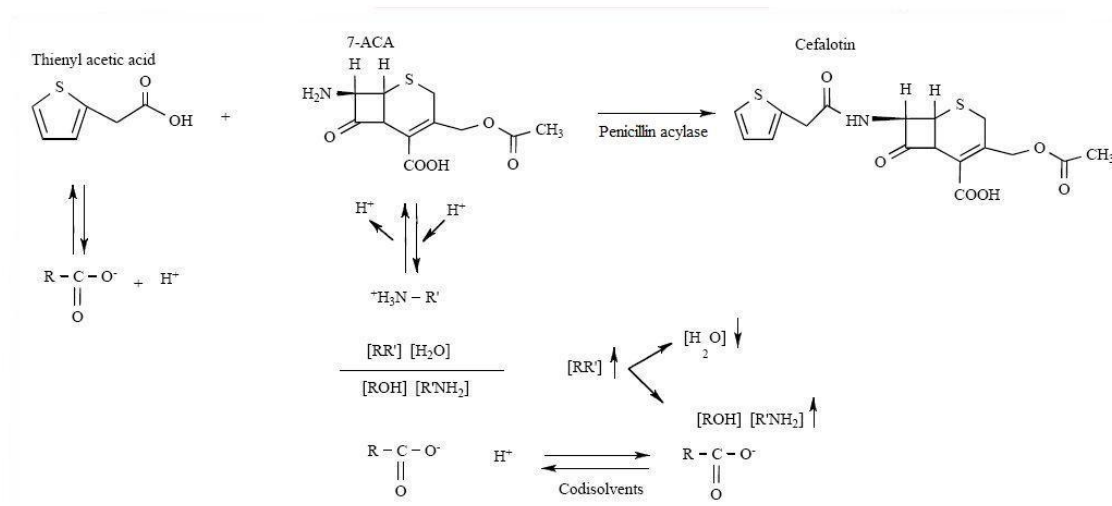
V dnešní době nahradila chemickou výrobu v Evropě enzymová produkce 7-ACA, bohužel největší producenti 7-ACA jsou Korea, Čína a Japonsko (Barber et al., 2004).

Enzymaticky lze produkovat 7-ACA z cefalosporinu C pomocí jednokrokové (one-step) či dvoukrokové (two-step) metody. První přístup využívá enzym cefalosporin-C-acylasu k přímé přeměně cefalosporinu C na 7-ACA. Tato přímá metoda se průmyslově nepoužívá, protože úroveň konverze katalyzovaná cefalosporin-C-acylasou je příliš nízká (Matsuda et al., 1987). Při two-step metodě reaguje v prvním kroku cefalosporin C s oxidasou D-aminokyselin (DAAO), která oxidativně deaminuje aminoadipylovou skupinu cefalosporinu C, za vzniku meziproductu α -ketoadipyl-7-ACA. Vedlejší produkt této reakce, peroxid vodíku, dále spontánně dekarboxyluje α -ketoadipyl-7-ACA, čímž vzniká glutaryl-7-ACA a CO₂. V druhém kroku dochází k hydrolýze vzniklé glutaryl-7-ACA na 7-ACA a kyselinu glutarovou pomocí glutarylacylasy (GA) (Shibuya et al., 1981). Nevýhoda této metody spočívá v tom, že vznikající peroxid vodíku zároveň inhibuje přítomné enzymy, zejména DAAO. Proto byly zkoumány možnosti, jak se této nežádoucí inhibici vyhnout. Peroxid vodíku byl z reakční směsi průběžně odstraňován a dekarboxylace byla katalyzována katalasou (Lopez-Gallego et al., 2005).

2.4 Enzymatická syntéza antibiotik

K syntéze dochází kondenzací modifikovaného postranního řetězce s β -laktamovým jádrem (6-APA, 7-ADCA nebo 7-ACA). Jádro se volí podle toho, jaký typ antibiotika chceme syntetizovat (peniciliny nebo cefalosporiny), přičemž postranní řetězec je charakteristický pro konkrétní antibiotikum (ampicilin, cefalexin, ...). Hlavní enzymy syntézy β -laktamových antibiotik v dnešní době, penicilinacylasy, mají „současné“ hydrolyzovat přírodní antibiotika (nejčastěji penicilin G) a syntetizovat nová semi-syntetická antibiotika. Vedlejší produkt hydrolýzy penicilinu G kyselina fenyloctová však silně inhibuje PA, a proto je třeba jej z reakční směsi odstraňovat (Alkema et al., 1999). Transferázová syntetická aktivita a hydrolýza probíhají na obou antibioticích (přírodním i syntetizovaném) a jdou proti sobě, takže v určitý okamžik je koncentrace semi-syntetického antibiotika nejvyšší a poté už jen klesá, protože dochází k jeho hydrolýze. Snahou je dosáhnout co největší výtěžek semi-syntetického antibiotika, což se děje pomocí dvou hlavních způsobů řízení enzymatické syntézy, a to termodynamicky či kineticky (Kasche et al., 1987).

2.4.1 Termodynamicky řízená syntéza

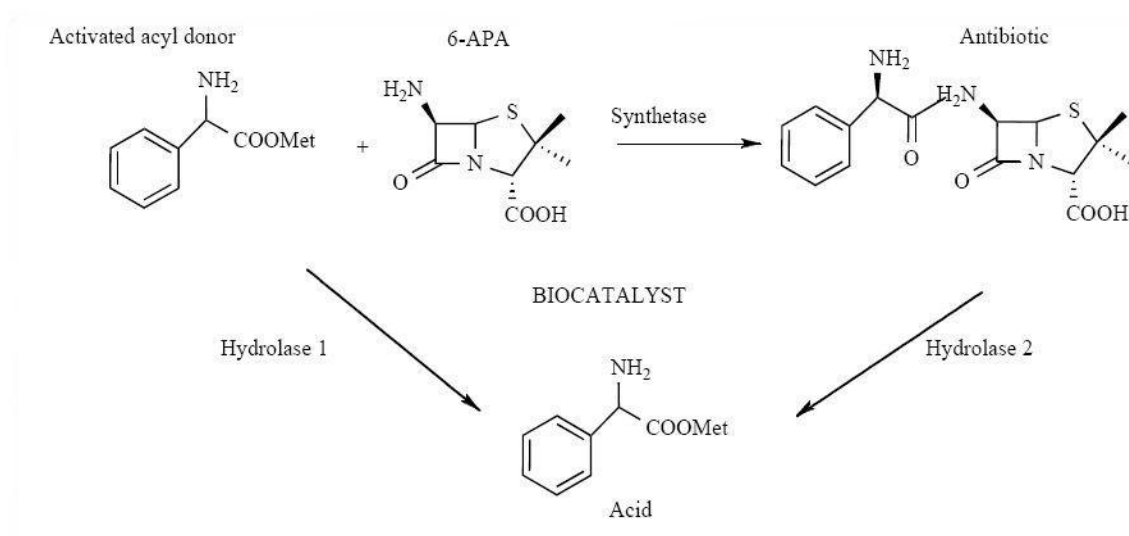


Obr. 6: Schéma termodynamicky řízené syntézy cefalotinu (Barber et al., 2004).

Reakční médium pro termodynamicky řízenou enzymatickou syntézu tvoří voda s příměsí různých organických rozpouštědel, které zvyšují výtěžnost reakce. (Fernandezlafuente et al., 1991; Fernandezlafuente et al., 1995; Fernandezlafuente et al., 1996a; Fernandezlafuente et al., 1996b) Reakční podmínky musí být nastaveny tak, aby karboxylová skupina vedlejšího řetězce byla přístupná nukleofilnímu ataku enzymu, a zároveň musí být neutrální rovněž aminoskupina β -laktamového jádra. Bohužel PGA z *E. coli* je synteticky aktivní v slabě kyselém pH, kdy je jen malé procento molekul substrátů přístupné nukleofilní reakci. (Schroen et al., 2001a; Schroen et al., 2001b) Tento problém lze vyřešit použitím hydrolas izolovaných z mikroorganismů rodu *Xanthomonas* (Svedas et al., 1980; Blinkovsky and Markaryan 1993), jejichž pH optimum je pro termodynamicky řízenou syntézu mnohem výhodnější - tyto enzymy však byly později zařazeny mezi esterasy- α -aminokyselin.

Další výzkumy se zaměřily na zajištění optimálních podmínek syntéz z hlediska používaných druhů organických rozpouštědel (Fernandezlafuente et al., 1996b). Nevýhodou organických rozpouštědel totiž je jejich destabilizující efekt na enzym vedoucí ke ztrátě jeho aktivity (Abian et al., 2001). Enzym je možné stabilizovat různými způsoby, přičemž nejčastějším způsobem je jeho imobilizace. Ta totiž nejenže stabilizuje enzym, čímž jej udržuje aktivní i v méně příznivých podmínkách, ale také usnadňuje manipulaci a opětovné použití enzymu. Přestože proces termodynamicky řízené syntézy se neustále optimalizuje a zlepšuje, častěji se používá kineticky řízená syntéza, protože poskytuje vyšší výnosy (Giordano et al., 2006).

2.4.2 Kineticky řízená syntéza



Obr. 7: Schéma kineticky řízené syntézy β -laktamových antibiotik (Barber et al., 2004).

Kineticky řízená syntéza se liší od termodynamicky řízené tím, že se k β -laktamovému jádru nepřidává acyldonor s COOH skupinou, ale jeho aktivovaný derivát, nejčastěji amid nebo ester. Nukleofilní atak β -laktamového jádra míří přímo na vazbu amidu případně esteru s enzymem, čímž je vyřešen problém s potřebou neutralizace karboxylové skupiny (Kasche et al., 1987). Nevýhodou tohoto typu syntézy je, že voda z prostředí kompetuje o nukleofilní atak vazby mezi acyldonorem a enzymem a zároveň tak stále dochází k hydrolyze nasyntetizovaného antibiotika.

Proces optimalizace kineticky řízené syntézy se ubíral mnoha směry: krystalizace produktu (Schroen et al., 2002), pH gradient v průběhu fermentace (Youshko et al., 2002), imobilizace enzymu (Guisan, 1988), mutované enzymy (Alkema et al., 2004), enzymy izolované z jiných organismů (Rocchietti et al., 2002), použití vedlejších rozpouštědel a snižování teploty (Kim and Lee, 1996; van Langen et al., 1999; Illanes et al., 2003; Illanes et al., 2004).

3. Enzymy účastníci se výrobou β -laktamových antibiotik

Produkce semi-syntetických β -laktamových antibiotik se mohou účastnit různé enzymy – mezi nejpoužívanější stále patří penicilinacylasy (PA), avšak začínají se prosazovat i cefalosporinacylasy (CA) a esterasy α -aminokyselin (AEH), které mají podobnou funkci jako PA. Navíc, pro výrobu prekurzorů semi-syntetických cefalosporinů jsou důležité i oxidasy D-aminokyselin a glutarylacylasy.

3.1 Penicilinacylasy (PA; EC 3.5.1.11)

Penicilinacylasy jsou nejpoužívanější enzymy farmaceutického průmyslu. Jejich hlavní funkce spočívá v hydrolýze penicilinů na kyselinu 6-aminopenicilanovou, 7-aminocefalosporanovou, 7-aminodeacetoxycefalosporanovou a samozřejmě také v reverzním procesu syntézy semi-syntetických penicilinů a cefalosporinů. Mimo to se začínají prosazovat i při syntézách peptidů, rozlišování racemických směsí či enantioselektivní acylaci. Penicilinacylasy patří do velké rodiny Ntn hydrolas (Brannigan et al., 1995), přičemž podle substrátu, který preferenčně hydrolyzují, je dělíme na penicilin-V-acylasy (PVA), penicilin-G-acylasy (PGA) a ampicilinacylasy (ApA).

3.1.1 Penicilin-V-acylasy

Penicilin-V-acylasy jsou produkovány různými mikroorganismy, a to jak prokaryotickými (bakterie, aktinomycety), tak eukaryotickými (kvasinky i plísně). Většinou jsou intracelulární (bakterie NRRL 11240, *Beijerinckia indica* var. *penicillanicum*, *Cryptococcus* sp., *Erwinia aroideae*, *Micrococcus ureae*, *Pseudomonas acidovorans*, *Rhodotorula glutinis*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp.), ale jsou popsány i mikroorganismy, které produkují enzym extracelulárně (*Bacillus sphaericus*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptoverticillium* sp., *Fusarium* sp. SKF 235 a *Pleurotus ostreatus*) (Kumar et al., 2008).

PVA jsou specifitější a používají se v jen pro výrobu 6-APA a 7-ADCA, takže jsou průmyslově méně používané než PGA (Sudhakaran et al., 1992b). Jde o enzymy různého charakteru, enzym izolovaný z *B. sphaericus* má např. formu tetrametru (Pundle 1995), zatímco enzym izolovaný z *Fusarium* sp. SKF 235 je pouze monomerní peptid (Sudhakaran et al., 1992a).

3.1.2 Penicilin-G-acylasy

Jde o nejpoužívanější PA označované rovněž jako benzylpenicilinacylasy. Jako vedlejší produkt hydrolýzy je uvolňována kyselina fenyloctová (PAA). PGA produkují nejrozličnější druhy bakterií - gram-negativní bakterie, mezi něž patří *Escherichia coli* (Cole, 1969; Sobotková et al., 1993), *Kluyveromyces citrophila* (Barbero et al., 1986), *Providencia rettgeri* (Klei et al., 1995), *Alcaligenes faecalis* (Verhaert et al., 1997) nebo *Achromobacter* sp. (Plháčková et al., 2003) ti mají PGA uloženou v periplasmatickém prostoru. Naopak gram-pozitivní bakterie *Bacillus megaterium* (Chiang and Bennett, 1967), *Arthrobacter viscosus* (Ohashi et al., 1988)

nebo *Bacillus badius* (Rajendhran and Gunasekaran, 2007) uvolňují PGA z buňky do média.

Kromě těchto zdrojů byla pomocí klonování a funkčního screeningu izolována penicilin-G-acylasa přímo z environmetální DNA izolované z půdního vzorku (Gabor et al., 2005).

PGA izolovaná z *E. coli* je heterodimer složený z α - (malé) a β - (velké) podjednotky. Velikost podjednotek je 209 a 557 aminokyselin, přičemž celý funkční dimer má velikost 86kDa. Tento enzym je klasifikován jako N-terminální nukleofilní hydroláza, neboť nejdůležitějším, dokonce esenciálním, aminokyselinovým zbytkem aktivního centra je nukleofilní Ser β 1 (Duggleby et al., 1995; Morillas et al., 1999).

Gen je tvořen čtyřmi doménami. 5'-konec strukturního genu představuje signální sekvence o velikosti 78 nukleotidů, avšak u organismů, které produkují enzym intracelulárně, tato sekvence chybí. K ní přiléhá úsek kódující α podjednotku mající 626 nukleotidů a 3'-konec strukturního genu tvoří úsek kódující β podjednotku s 1670 nukleotidy. Oba tyto úseky genu odděluje oblast o délce 161 nukleotidů, tzv. spacer (Robas and Branlant, 1994). Překladem vzniká jeden polypeptidový prekurzor, u něž dochází k samostatnému sestřihu za vzniku aktivního enzymu (Flores et al., 2004).

V současné době je produkce PGA zajišťována zejména rekombinantními systémy *E. coli*. K průmyslové produkci PGA se používají převážně přítokové (fed-batch) kultivace, protože umožňují vysokou produkci biomasy ve specifickém čase a podmínkách (Yang et al., 2006; Zhang et al., 2006). Během fed-batch kultivace je dodáván čerstvý substrát, aby se zvýšila biomasa a tím i celkové množství PGA v jednotkovém objemu kultury. Přítok je veden tak, aby množství enzymu v periplasmatickém prostoru bylo maximální (Rajendhran et al., 2002; Yang et al., 2006).

3.1.3 Ampicilinacylasy

Jsou enzymy, které specificky hydrolyzují ampicilin. Poprvé byly popsány u rodu *Flavobacterium* (Hamilton-Miller, 1966; Shewale and SivaRaman, 1989) a *Pseudomonas* (Kim and Byun, 1990; Francetic 1988).

3.2 Esterasy α -aminokyselin (AEH; EC 3.1.1.43)

Jde o skupinu relativně nových enzymů hydrolyzujících či syntetizujících estery a amidy s L i D- α -aminoskupinou. Hlavní význam těchto enzymů spočívá v tom, že jsou schopné syntetizovat β -laktamová antibiotika (ampicilin, amoxicilin, cefalexin, ...)

z β -laktamového jádra a acyldonoru, podobně jako penicilinacylasy, avšak nejsou inhibovány kyselinou fenyloctovou, nemají alkalické pH optimum, které by destabilizovalo β -laktamové jádro, a přijímají nabitě acyldonory (Barends et al., 2003).

AEH byly popsány a charakterizovány u různých mikroorganismů: *Acetobacter turbidans* ATCC 9325 (Takahashi et al., 1974), *Bacillus mycoides* (Sugihara et al. 2001), *Xanthomonas citri* (Kato et al., 1980) a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Blum and Bommarius, 2010)

AEH podle aktivního místa patří do rodiny serin hydrolas, jejich aktivní místo vázající α -aminoskupinu je tvořeno trojkombinací Ser-His-Asp, kde je His odstíněn pomocí shluku kyselých zbytků. Inhibičně na AEH působí PMSF, jinak nebyla zjištěná inhibice ani penicilinem G, ani ampicilinem, z čehož vyplývá, že AEH neváže penicilin. (Sugihara et al., 2001)

Enzym izolovaný z *B. mycoides* je homotetramer a každá jeho podjednotka má velikost 39kDa (Sugihara et al. 2001). Podle analýzy AEH izolovaného z *X. citri* vyplývá, že nativní protein má opět tetramerní strukturu a vykazuje vysokou homologii s glutaryl-7-ACA-acylasou z *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Barends et al., 2003).

3.3 Cefalosporinacylasy (CA; EC 3.5.1.11)

Cefalosporinacylasy jsou enzymy schopné štěpit cefalosporin C, glutaryl-7-ACA a glutaryl-7-ADCA za vzniku 7-ACA (Sudhakaran et al., 1992a).

Cefalosporin acylasy je možné rozdělit na pravé cefalosporin-C-acylasy a ostatní glutarylacylasy. Pravé cefalosporinacylasy hydrolyzující pouze cefalosporin C a patří sem acylasa izolovaná z *Aeromonas* sp. (Deshpande et al., 1996) a kmene *Pseudomonas* N176 (Aramori et al., 1991a). Tyto enzymy byly detailně zkoumány na enzymu izolovaném z *Pseudomonas* sp. 130, podle toho byly zařazeny mezi N-terminální hydrolasy, stejně jako penicilinacylasy (Li et al., 1999).

Nejvíce popsaných cefalosporinacylas je schopno hydrolyzovat glutaryl-7-ACA a slaběji také cefalosporin C a glutaryl-7-ADCA. Tyto glutarylacylasy produkují např. kmeny rodu *Pseudomonas* (Aramori et al., 1991a), *Bacillus* (Sonawane et al., 1996) a *Arthrobacter* (Zhang and Xu, 1993). Jiný typ glutarylacylas hydrolyzuje glutaryl-7-ADCA a jejich zástupcem je enzym z *Achromobacter xyloxidans* (Franzosi et al., 1995).

Glutarylacylasy (glutaryl-7-ACA-acylasy; GA) byly detailně charakterizovány na enzymu GK16 izolovaném z *Pseudomonas* sp. (Matsuda et al., 1987) Jde o

nejpoužívanější enzymy z cefalosporinacylas schopné hydrolyzovat glutaryl-7-ACA a méně ochotně též cefalosporin C na 7-ACA (Zhang et al., 2006), přičemž jsou v mnoha směrech podobné penicilinacylasam (Aramori et al., 1991b).

Výše zmíněný enzym GK16 vzniká z jediného prekursoru a je ve formě 2 různých podjednotek translokován do periplasmatického prostoru, kde dochází ke spojení obou podjednotek enzymu (Matsuda et al., 1987). V tom se liší od acylas z *Bacillus* sp., které nevykazují dimerní charakter (Aramori et al., 1991b).

3.4 Oxidasy D-aminokyselin (DAAO; EC 1.4.3.3)

Oxidasy D-aminokyselin byly nalezeny v kvasinkách (*Trigonopsis variabilis*, *Rhodotorula gracilis*) (Kubicekpranz and Rohr, 1985; Pilone et al., 1989) a houbách (*Fusarium solani*) (Isogai et al., 1990). Katalyzují oxidativní deaminaci D-aminokyselin na odpovídající α -iminokyseliny. Ty se následně neenzymaticky rozpadají na 2-oxo kyseliny, amoniak a peroxid vodíku. Funkce těchto enzymů v organismech je zatím nejasná, ale výzkum ukázal jejich použití pro deaminaci cefalosporinu C na kyselinu

α -ketoadipyl-7-aminocefalosporanovou, která figuruje jako meziprodukt v enzymové produkci 7-ACA (Konno and Yasumura, 1992).

4. Vylepšování enzymů transformujících β -laktamová antibiotika

Enzymatická výroba semi-syntetických antibiotik se ukázala jako velice výhodná, a proto se vědci snaží pomocí různých metod, jako jsou genové manipulace, proteinové inženýrství nebo imobilizace enzymů, modifikovat „přírodní“ enzymy tak, aby výkonně fungovaly v podmínkách vhodných pro průmyslovou výrobu. V tomto ohledu je pokrok ve výrobě β -laktamových antibiotik pomocí enzymů ojedinělý a neobyčejně úspěšný. Nejnovějšími směry při vylepšování „průmyslových“ vlastností jsou cílená (site-directed) mutageneze, mísení genů (gene-shuffling) a imobilizace odpovídajících genových produktů, popřípadě celých buněk.

Imobilizace je v průmyslu velmi využívaný způsob, jak pozměnit enzymové vlastnosti, a to zejména co se týče stability a opětovného použití enzymu. Bohužel, enzym musí mít „imobilizační“ doménu, která není katalytická, aby se mohl vázat na nosič, a dostatečnou aktivitu v nativním stavu. Na nosič se enzymy vážou obvykle iontovými, van der Waalsovými a hydrofobními interakcemi, které obvykle nevydrží v prostředí průmyslové výroby, nebo vazbami kovalentními (Bickerstaff 1997).

Imobilizace však může probíhat i bez nosiče, kdy dochází k tvorbě krystalů (CLEC), agregátů (CLEA) nebo inkluzních tělísek (IB) (Tischer et al., 1992). Zvláštní kategorii tvoří vazba na křemičitanové nanočástice, které mají obrovský povrch pro vazbu enzymů a malý objem (Reetz, 1997).

4.1 Penicilinacylasy

Mutagenizace pomocí mutagenních látek je jednoduchá metoda jak změnit vlastnosti enzymu. Příkladem je trojnásobné zvýšení aktivity produkovaného enzymu PGA pomocí mutagenyze N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidinem (Arshad et al., 2010a), případně nalezení kmene produkujícího PGA s vysokou aktivitou a zároveň s minimální produkcí β -laktamas po působení UV (Arshad et al., 2010b). Na stejném principu, ale řízeněji, funguje side-directed mutagenyze. Tyto mutanty vznikají tak, že část genu kódujícího protein je nahrazena jinou mutantní sekvencí (Choi et al., 1992). Změnou fenylalaninu na alanin v pozici 24 v β podjednotce došlo např. k vyšší rezistenci ke koncentraci PAA, zvýšení acylasové aktivity a změně S/H (syntéza/hydrolýza) poměru (Alkema et al., 2000).

Saturační mutagenyze je cílená mutagenyze, kdy jsou vytvořeny všechny možné mutantní kombinace. Saturační mutagenyze byla prováděna na aminokyselinových zbytcích Arg145 a Phe146 α podjednotky PGA izolované z *E. coli*. Při mutaci v α Arg145 byly nalezeny 3 enzymy, které vykazovaly prokazatelně lepší syntetickou aktivitu než původní enzym (Jager et al., 2008). Tento typ mutagenyze byl také použit na vylepšení stereoselektivních vlastností PGA. Mutagenézí postranních řetězců v aktivním místě byly připraveny PGA, které preferují vznik S-enantiomerů. R-selektivní mutanty PGA byly nalezeny při mutagenyzi 24. aminokyseliny v β podjednotce a měly též lepší S/H poměr při dodání čistého R-enantiomeru příslušného substrátu (Deaguero et al., 2012).

Gene shuffling je metoda genového inženýrství, která umožňuje získat modifikovaný gen z těch již existujících. Touto metodou byly spojeny 3 geny kódující PGA z *E. coli*, *P. rettgeri* a *K. cryocrescens*, přičemž vznikly 3 vylepšené mutantní genové produkty se zvýšenou aktivitou a lepším S/H poměrem. Jeden z nich navíc vykazoval nižší inhibici kyselinou fenylactovou (Jager et al., 2007).

4.2 Esterasy α -aminokyselin

Vylepšování vlastností pomocí mutací se zkoušelo i na AEH. Mutantní kmen *A. turbidans* T206A, s bodovou mutací Tyr²⁰⁶ \rightarrow Ala²⁰⁶ v α/β hydrolasové doméně,

vykazoval jak sníženou míru hydrolýzy a rovnováhu posunutou ve směru syntézy antibiotika, tak i zvýšenou toleranci k hromadění konečného produktu syntézy antibiotik (Polderman-Tijmes et al., 2002)

4.3 Glutarylacylasy

Zlepšování syntetických vlastností a stability enzymu probíhalo pomocí site-directed mutagenese. Vznikly 2 mutantní enzymy se srovnatelnou aktivitou vůči sobě, ale vyšší vůči výchozí glutarylacylase CA130. Mutace vedoucí k odolnosti vůči alkalickému pH a pro zvýšení aktivity byly spojeny do jednoho genu, jehož produkt by mohl být po imobilizaci používán ve výrobě (Zhang et al., 2006).

Saturační mutagenese byla využita ve studii mutovaných glutarylacylas, kde Asn266 byl nahrazen jinými aminokyselinami za vzniku 16 stabilních mutantů, které byly detailně charakterizovány. Mutace u většiny rozšířila jejich substrátovou specifitu, některé mutanty měly mírně zvýšenou aktivitu na cefalosporin C, což potvrzuje hypotézu, že mutagenesí glutarylacylas je možné připravit pravé cefalosporinacylasy (Otten et al., 2004).

Dále se pomocí kumulativní saturační mutagenese mnohonásobně zvýšila aktivita glutarylacylasy izolované z *Pseudomonas diminuta* na cefalosporin C. Za tímto účelem byly modifikovány zbytky, které zasahují do katalytického centra enzymu, ale nejsou esenciální pro hydrolýzu. Dva ze získaných mutantů vykazovaly vyšší hydrolytickou aktivitu než původní enzym. U těch byly mutovány ještě další postranní řetězce, čímž se předchozí výhodná mutace mohla plně projevit. Takto byl výsledně připraven trojnásobný mutant s osminásobnou hydrolytickou aktivitou na cefalosporin C oproti původnímu enzymu, ale sníženou aktivitou vůči glutaryl-7-ACA (Oh et al., 2003).

Závěr

Úspěšně se rozvíjející aplikace penicilin-G-acylas do výroby β -laktamů dokazuje, že použití těchto enzymů v průmyslu je možné a dokonce i velmi výhodné, takže cílem do budoucna je kompletní a komplexní nahrazení chemické výroby enzymovou („green technology“).

Ovšem i stávající biokatalytickou výrobu β -laktamových antibiotik lze zlepšovat díky modifikacím enzymů, popřípadě použitím jiných enzymů s vlastnostmi požadovanými farmaceutickým průmyslem. V tomto směru se nabízí potenciální využití penicilin-V-acylas, cefalosporinacylas a esterasy α -aminokyselin, jakož i vyhledávání homologních metagenomických genů přímo z enviromentální DNA, která je prakticky jejich nevyčerpatelným a dosud neprobádaným zdrojem.

Jelikož gen kódující PGA z metagenomu byl již publikován, ale o metagenomických PVA nebo AEH není nic známo, ráda bych se ve své další vědecké činnosti věnovala izolaci unikátních strukturních genů přímo z metagenomické DNA kódujících nové enzymy využitelné pro výrobu β -laktamů.

Seznam citací

- Abian, O., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Fernandezlafuente, R., Guisan, J.M., 2001. Stabilization of immobilized enzymes against water-soluble organic cosolvents and generation of hyper-hydrophilic micro-environments surrounding enzyme molecules. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 489-503.
- Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Dunn, W., Schenck, J.R., Hargie, M.P., Olson, B.H., Schuurmans, D.M., Fisher, M.W., Fusari, S.A., 1955. Identity of cephalosporin-N- and synnematin-B. *Nature* 176, 551-551.
- Alkema, W.B.L., Floris, R., Janssen, D.B., 1999. The use of chromogenic reference substrates for the kinetic analysis of penicillin acylases. *Analytical Biochemistry* 275, 47-53.
- Alkema, W.B.L., Hensgens, C.M.H., Kroezinga, E.H., de Vries, E., Floris, R., van der Laan, J.M., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B., 2000. Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. *Protein Engineering* 13, 857-863.
- Alkema, W.B.L., Hensgens, C.M.H., Snijder, H.J., Keizer, E., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B., 2004. Structural and kinetic studies on ligand binding in wild-type and active-site mutants of penicillin acylase. *Protein Engineering Design & Selection* 17, 473-480.
- Allison, V.D., 1956. Felming, Alexander, 1881-1955. *Journal of General Microbiology* 14, 1-13.
- Andersson, I., van Scheltinga, A.C.T., Vøllestad, K., 2001. Towards new beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1897-1906. (R)
- Aramori, I., Fukagawa, M., Tsumura, M., Iwami, M., Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Kohsaka, M., Ueda, Y., Imanaka, H., 1991a. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin-C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 72, 232-243.
- Aramori, I., Fukagawa, M., Tsumura, M., Iwami, M., Ono, H., Kojo, H., Kohsaka, M., Ueda, Y., Imanaka, H., 1991b. Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7-beta-(4-carboxybutanamido)cephalosporinic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173, 7848-7855.
- Arshad, R., Farooq, S., Ali, S.S., 2010a. Effect of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on expression of penicillin G acylase and beta-lactamase in wild-type *Escherichia coli* strains. *Annals of Microbiology* 60, 645-652.
- Arshad, R., Farooq, S., Ali, S.S., 2010b. Improvement of penicillin G acylase expression in *Escherichia coli* through UV induced mutations. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 1133-1141.
- Baldwin, J.E., Goh, K.C., Schofield, C.J., 1992. Oxidation of deacetoxycephalosporin C/deacetylcephalosporin-C synthase. *Journal of Antibiotics* 45, 1378-1381.
- Ball, P., Geddes, A., Rolinson, G., 1997. Amoxycillin clavulanate: An assessment after 15 years of clinical application. *Journal of Chemotherapy* 9, 167-198.
- Ballio, A., Chain, E.B., Denticediaccadia, F., Mastropietrocancellieri, M.F., Morpurgo, G., Serlupicrescenzi, G., Sermonti, G., 1960. Incorporation of alpha, omega-

- dicarboxylic acids as side-chains into the penicillin molecule. *Nature* 185, 97-99.
- Barber, M.S., Giesecke, U., Reichert, A., Minas, W., 2004. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams. *Molecular Biotechnology of Fungal Beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases* 88, 179-215.
- Barbero, J.L., Buesa, J.M., Debuitrago, G.G., Mendez, E., Perezaranda, A., Garcia, J.L., 1986. Complete nucleotide-sequence of the penicillin acylase gene from *Kluyvera-citrophila*. *Gene* 49, 69-80.
- Barends, T.R.M., Polderman-Tijmes, J.J., Jekel, P.A., Hensgens, C.M.H., de Vries, E.J., Janssen, D.B., Dijkstra, B.W., 2003. The sequence and crystal structure of the alpha-amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of beta-lactam antibiotic acylases. *Journal of Biological Chemistry* 278, 23076-23084.
- Bede, M. 1969. Werkwijze voor de bereiding van 7-aminocefalosporaanzuur en derivaten daarvan. Patent BE718824, Belgium
- Bickerstaff, G.F., 1997. Immobilization of enzymes and cells. Humana Press, Totowa
- Blinkovsky, A.M., Markaryan, A.N., 1993. Synthesis of beta-lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide aminohydrolase. *Enzyme Microbial Technology* 15, 965-973.
- Blum, J.K., Bommarius, A.S., 2010. Amino ester hydrolase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ATCC 33913 for enzymatic synthesis of ampicillin. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 67, 21-28.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G., 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416-419.
- Bunnell, C.A., Luke, W.D., Perry Jr., F.M., 1986. In beta-lactam antibiotics for clinical use. (Eds.: S. F. Queener, J. A. Webber, S. W. Queener), Marcel Dekker, New York, 255-283
- Cantwell, C., Beckmann, R., Whiteman, P., Queener, S.W., Abraham, E.P., 1992. Isolation of deacetoxycephalosporin-C from fermentation broths of *Penicillium-chrysogenum* transformants - construction of a new fungal biosynthetic-pathway. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 248, 283-289.
- Cantwell, C.A., Beckmann, R.J., Dotzlaf, J.E., Fisher, D.L., Skatrud, P.L., Yeh, W.K., Queener, S.W., 1990. Cloning and expression of a hybrid *Streptomyces-clavuligerus cefe* gene in *Penicillium-chrysogenum*. *Current Genetics* 17, 213-221.
- Cauvette, R.R. 1969. Verfahren zur Abspaltung der 7-Carboxamidogruppe einer Cephalosporinverbindung. Patent DE2056491, Deutschland
- Chandel, A.K., Rao, L.V., Narasu, M.L., Singh, O.V., 2008. The realm of penicillin G acylase in beta-lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 199-207.
- Chiang, C., Bennett, R.E., 1967. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 93, 302-308.
- Choi, K.S., Kim, J.A., Kang, H.S., 1992. Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin-G acylase from *Escherichia-coli* ATCC-11105. *Journal of Bacteriology* 174, 6270-6276.
- Cole, M., 1969. Hydrolysis of penicillins and related compounds by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 115, 733-739.

- Craig, L.C., Hogeboom, G.H., Carpenter, F.H., Duvigneaud, V., 1947. Separation and characterization of some penicillins by the method of counter-current distribution. *Journal of Biological Chemistry* 168, 665-686.
- Crowfoot, D., 1948. X-ray crystallographic studies of compounds of biochemical interest. *Annual Review of Biochemistry* 17, 115-146.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-382. (R)
- De Souza, V.R., Silva, A.C.G., Pinotti, L.M., Araujo, H.S.S., Giordano, R.D.C., 2005. Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 105-111.
- Deaguero, A.L., Blum, J.K., Bommarius, A.S., 2012. Improving the diastereoselectivity of penicillin G acylase for ampicillin synthesis from racemic substrates. *Protein Engineering Design & Selection* 25, 135-144.
- Denome, S.A., Elf, P.K., Henderson, T.A., Nelson, D.E., Young, K.D., 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: Viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *Journal of Bacteriology* 181, 3981-3993.
- Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Shewale, J.G., 1996. Cephalosporin C acylase and penicillin V acylase formation by *Aeromonas* sp ACY 95. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12, 373-378.
- Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C.E., 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature* 373, 264-268.
- Elander, R.P., 1983. Strain improvement and preservation of beta-lactam-producing microorganisms. In: Demain, A.L., Solomon, N.A. (eds.): *Antibiotics containing the beta-lactam structure*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 1, 97-146.
- Elander, R.P., 2003. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 385-392.
- Fechtig, B., Peter, H., Bickel, H., Vischer, E., 1968. Modifications of antibiotics .2. Preparation of 7-aminocephalosporanic acid. *Helvetica Chimica Acta* 51, 1108-1119.
- Fernandezlafuente, R., Rosell, C.M., Guisan, J.M., 1991. Enzyme reaction-engineering - synthesis of antibiotics catalyzed by stabilized penicillin-g acylase in the presence of organic cosolvents. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 898-905.
- Fernandezlafuente, R., Rosell, C.M., Guisan, J.M., 1995. The use of stabilized penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. *Journal of molecular catalysis a-chemical* 101, 91-97.
- Fernandezlafuente, R., Rosell, C.M., Guisan, J.M., 1996a. Dynamic reaction design of enzymic biotransformations in organic media: equilibrium-controlled synthesis of antibiotics by penicillin G acylase. *Biotechnology and applied biochemistry* 24, 139-143.
- Fernandezlafuente, R., Rosell, C.M., Piatkowska, B., Guisan, J.M., 1996b. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enzyme and microbial technology* 19, 9-14.
- Flores, G., Soberon, X., Osuna, J., 2004. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin g acylase. *Protein science* 13, 1677-1683.

- Florey, H.W., Chain, E.B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P., Florey, M.E., 1949. Antibiotics. vol 2. Oxford University Press, London
- Francetic, O., Deretic, V., Marjanovic, N., Glisin, V., 1988. Penicillin acylases: Their function, structures, genes and commercial applications. *Biotech-Forum* 5, 90-94.
- Franzosi, G., Battistel, E., Gagliardi, I., Vandergoes, W., 1995. Screening and characterization of microorganisms with glutaryl-7-ADCA acylase activity. *Applied microbiology and biotechnology* 43, 508-513.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B., 2005. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 182-190.
- Giordano, R.C., Ribeiro, M.P.A., Giordano, R.L.C., 2006. Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology Advances* 24, 27-41. (R)
- Guisan, J.M., 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and microbial technology* 10, 375-382.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 1966. Penicillinacylase. *Bacteriological reviews* 30, 761-771.
- Harrison, F.G., Gibson, E.D., 1984. Approaches for reducing the manufacturing costs of 6-aminopenicillanic acid. *Process biochemistry* 19, 33-36.
- Herschbach, G.J.M., van der Beek, C.P., van Dijck, P.W.M., 1984. In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. (Ed.: E. J. Vandamme), Marcel Dekker, New York, 45-140.
- Hayes, J.D., Wolf, C.R., 1990. Molecular mechanisms of drug-resistance. *Biochemical Journal* 272, 281-295. (R)
- Illanes, A., Anjari, M.S., Altamirano, C., Aguirre, C., 2004. Optimization of cephalixin synthesis with immobilized penicillin acylase in ethylene glycol medium at low temperatures. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 30, 95-103.
- Illanes, A., Cabrera, Z., Wilson, L., Aguirre, C., 2003. Synthesis of cephalixin in ethylene glycol with glyoxyl-agarose immobilised penicillin acylase: temperature and ph optimisation. *Process Biochemistry* 39, 111-117.
- Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y., Kohsaka, M., 1990. Structure and expression of cDNA for D-amino-acid oxidase active against cephalosporin-c from *Fusarium-solani*. *Journal of biochemistry* 108, 1063-1069.
- Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1991. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1697-1704. (R)
- Jager, S.A.W., Jekel, P.A., Janssen, D.B., 2007. Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of beta-lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1335-1344.
- Jager, S.A.W., Shapovalova, I.V., Jekel, P.A., Alkema, W.B.L., Svedas, V.K., Janssen, D.B., 2008. Saturation mutagenesis reveals the importance of residues alpha R145 and alpha F146 of penicillin acylase in the synthesis of beta-lactam antibiotics. *Journal of Biotechnology* 133, 18-26.
- Jensen, S.E., Westlake, D.W.S., Wolfe, S., 1985. Deacetoxycephalosporin-c synthetase and deacetoxycephalosporin-C hydroxylase are 2 separate enzymes in *Streptomyces-clavuligerus*. *Journal of antibiotics* 38, 263-265.
- Jovetic, S., Zhu, Y., Marcone, G.L., Marinelli, F., Tramper, J., 2010. Beta-lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends in Biotechnology* 28, 596-604.

- Kasche, V., Haufler, U., Riechmann, L., 1987. Equilibrium and kinetically controlled synthesis with enzymes - semisynthesis of penicillins and peptides. *Methods in enzymology* 136, 280-292.
- Kato, K., Kawahara, K., Takahashi, T., Kakinuma, A., 1980. Studies on alpha-amino-acid ester hydrolase of *Xanthomonas-citri* .1. Purification of alpha-amino-acid ester hydrolase from *Xanthomonas-citri*. *Agricultural and biological chemistry* 44, 1069-1074.
- Kim, D.J., Byun, S.M., 1990. Purification and properties of ampicillin acylase from *Pseudomonas-melanogenum*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1040, 12-18.
- Kim, M.G., Lee, S.B., 1996. Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: Interaction of organic solvents with enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 1, 181-190.
- Klei, H.E., Daumy, G.O., Kelly, J.A., 1995. Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin-G acylase from *Providencia-retti*. *Protein science* 4, 433-441.
- Konno, R., Yasumura, Y., 1992. D-amino-acid oxidase and its physiological-function. *International journal of biochemistry* 24, 519-524.
- Kubicekpranz, E.M., Rohr, M., 1985. D-amino-acid oxidase from *Trigonopsis-variabilis* - comparison of enzyme specificity invivo and invitro. *Biotechnology letters* 7, 9-14.
- Kumar, A., Prabhune, A., Suresh, C.G., Pundle, A., 2008. Characterization of smallest active monomeric penicillin V acylase from new source: a yeast, *Rhodotorula aurantiaca* (NCIM 3425). *Process biochemistry* 43, 961-967. (R)
- Kupka, J., Shen, Y.G., Wolfe, S., Demain, A.L., 1983. Studies on the ring-cyclization and ring-expansion enzymes of beta-lactam biosynthesis in *Cephalosporium-acremonium*. *Canadian journal of microbiology* 29, 488-496.
- Li, Y., Chen, J.F., Jiang, W.H., Mao, X., Zhao, G.P., Wang, E.D., 1999. In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* sp 130. *European Journal of Biochemistry* 262, 713-719.
- Livermore, D.M., 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews* 8, 557-584. (R)
- Lopez-Gallego, F., Batencor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Fernandezlafuente, F., Guisan, J.M., 2005. One-pot conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid in the absence of hydrogen peroxide. *Advanced synthesis & catalysis* 347, 1804-1810.
- Lubbe, C., Wolfe, S., Demain, A.L., 1986. Isopenicillin-N epimerase activity in a high cephalosporin-producing strain of *Cephalosporium-acremonium*. *Applied microbiology and biotechnology* 23, 367-368.
- Martin, W.J., Nichols, D.R., Heilman, F.R., 1955. Penicillin-V, a new type of penicillin - preliminary clinical and laboratory observations. *Proceedings of the staff meetings of the mayo clinic* 30, 467-476.
- Matsuda, A., Matsuyama, K., Yamamoto, K., Ichikawa, S., Komatsu, K.I., 1987. Cloning and characterization of the genes for 2 distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *Journal of bacteriology* 169, 5815-5820.
- Morillas, M., Goble, M.L., Virden, R., 1999. The kinetics of acylation and deacylation of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105: evidence for lowered pk(a) values of groups near the catalytic centre. *Biochemical Journal* 338, 235-239.
- Morin, R.B., Andrews, S.L., Mueller, R.A., Scanlon, W.B., Jackson, B.G., Lavagnino, E.R., 1963. Chemistry of cephalosporin antibiotics .3. Chemical correlation of

- penicillin and cephalosporin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* 85, 1896-1897.
- Novak, I., C.P.J., 2006. Computational study of pharmacophores: beta-lactams. *Journal of physical chemistry A*, pp. 10521-10524.
- Oh, B., Kim, M., Yoon, J., Chung, K., Shin, Y., Lee, D., Kim, Y., 2003. Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310, 19-27.
- Ohashi, H., Katsuta, Y., Hashizume, T., Abe, S.N., Kajiura, H., Hattori, H., Kamei, T., Yano, M., 1988. Molecular-cloning of the penicillin-G acylase gene from *Arthrobacter-viscosus*. *Applied and environmental microbiology* 54, 2603-2607.
- Ospina, S., Barzana, E., Ramirez, O.T., Lopezmunguia, A., 1996. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and microbial technology* 19, 462-469.
- Otten, L.G., Sio, C.F., van der Sloot, A.M., Cool, R.H., Quax, W.J., 2004. Mutational analysis of a key residue in the substrate specificity of a cephalosporin acylase. *Chembiochem* 5, 820-825.
- Pilone, M.S., Pollegioni, L., Casalin, P., Curti, B., Ronchi, S., 1989. Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula-gracilis*. *European journal of biochemistry* 180, 199-204.
- Plháčková, K., Bečka, S., Škrob, F., Kyslík, P., 2003. Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp with beta-lactam antibiotic acylase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, 507-516.
- Polderman-Tijmes, J.J., Jekel, P.A., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., van der Laan, J.M., Sonke, T., Janssen, D.B., 2002. Identification of the catalytic residues of alpha-amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans* by labeling and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28474-28482.
- Pundle, A. V., 1995. Microbial enzymes: Studies on penicillin V acylase (EC. 3.5.1.11) from *Bacillus sphaericus*. Ph.D. thesis, University of Pune, India
- Queener, S.W., 1990. Molecular-biology of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34, 943-948. (R)
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P., 2007. Molecular cloning and characterization of thermostable beta-lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103, 457-463.
- Rajendhran, J., Krishnakumar, V., Gunasekaran, P., 2002. Optimization of a fermentation medium for the production of penicillin G acylase from *Bacillus* sp. *Letters in Applied Microbiology* 35, 523-527.
- Reetz, M.T., 1997. Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Advanced Materials* 9, 943-954.
- Robas, N., Branlant, C., 1994. The expression of the penicillin-G amidase gene of *Escherichia-coli* by primer extension analysis. *Current microbiology* 29, 263-268.
- Rocchietti, S., Urrutia, A.S., Pregnotato, M., Tagliani, A., Guisan, J.M., Fernandezlafuente, R., Terreni, M., 2002. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantio selectivity of penicillin G acylase. *Enzyme and microbial technology* 31, 88-93.
- Rolinson, G.N., Batchelor, F.R., Butterworth, D., Cameronwood, J., Cole, M., Eustace, G.C., Hart, M.V., Richards, M., Chain, E.B., 1960. Formation of 6-

- aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. *Nature* 187, 236-237.
- Schroen, C., Eldin, M.S.M., Janssen, A.E.M., Mita, G.D., Tramper, J., 2001a. Cephalixin synthesis by immobilised penicillin G acylase under non-isothermal conditions: reduction of diffusion limitation. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 15, 163-172.
- Schroen, C., Nierstrasz, V.A., Bosma, R., Kroon, P.J., Tjeerdsma, P.S., devroom, E., vanderlaan, J.M., Moody, H.M., Beeftink, H.H., Janssen, A.E.M., Tramper, J., 2002. Integrated reactor concepts for the enzymatic kinetic synthesis of cephalixin. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 144-155.
- Schroen, C., Nierstrasz, V.A., Moody, H.M., Hoogschagen, M.J., Kroon, P.J., Bosma, R., Beeftink, H.H., Janssen, A.E.M., Tramper, J., 2001b. Modeling of the enzymatic kinetic synthesis of cephalixin - Influence of substrate concentration and temperature. *Biotechnology and Bioengineering* 73, 171-178.
- Schroen, C., vandewiel, S., Kroon, P.J., devroom, E., Janssen, A.E.M., Tramper, J., 2000. Equilibrium position, kinetics, and reactor concepts for the adipyl-7-ADCA-hydrolysis process. *Biotechnology and Bioengineering* 70, 654-661.
- Sheldon, R.A., Downing, R.S., 1999. Heterogeneous catalytic transformations for environmentally friendly production. *Applied Catalysis a-General* 189, 163-183. (R)
- Shewale, J.G., SivaRaman, H., 1989. Penicillin acylase: Enzyme production and its application in manufacture of 6-APA. *Process Biochemistry* 24, 97-103.
- Shibuya, Y., Matsumoto, K., Fujii, T., 1981. 7-aminocephalosporanic acid production .1. Isolation and properties of 7-beta-(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. *Agricultural and biological Chemistry* 45, 1561-1567.
- Sobotková, L., Plháčková, K., Kyslík, P., Vojtíšek, V., 1993. Rekombinantní plazmidy, nesoucí gen pro PGA, a kmeny mikroorganismu *Escherichia coli*, obsahující tyto plazmidy. Patent CZ278516, Česká Republika
- Sonawane, V.C., Jolly, R.S., Vohra, R.M., 1996. Cephalosporin modification: An extracellular glutaryl-7-ACA acylase from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 18, 965-968.
- Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Shewale, J.G., 1992a. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases. *Process biochemistry* 27, 131-143.
- Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Shewale, J.G., Naik, S.R., 1992b. Production of 6-apa using a recirculated packed-bed batch reactor. *Biotechnology letters* 14, 913-918.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Sugihara, S., Nagao, T., Watanabe, Y., Tominaga, Y., 2001. A novel alpha-amino-acid esterase from *Bacillus mycoides* capable of forming peptides of DD- and DL-configurations. *Journal of biochemistry* 130, 119-126.
- Svedas, V.K., Margolin, A.L., Borisov, I.L., Berezin, I.V., 1980. Kinetics of the enzymatic-synthesis of benzylpenicillin. *Enzyme and microbial technology* 2, 313-317.
- Takahashi, T., Yamazaki, Y., Kato, K., 1974. Substrate-specificity of an alpha-amino-acid ester hydrolase produced by *Acetobacter-turbidans* ATCC 9325. *Biochemical journal* 137, 497-503.
- Tischer, W., Giesecke, U., Lang, G., Roder, A., Wedekind, F., 1992. Biocatalytic 7-aminocephalosporanic acid production. *Annals of the new york academy of sciences* 672, 502-509.

- Van Langen, L.M., de Vroom, E., van Rantwijk, F., Sheldon, R., 1999. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics using penicillin-G acylase in frozen media. *Febs letters* 456, 89-92.
- Verhaert, R.M.D., Riemens, A.M., van der Laan, J.M., Vanduin, J., Quax, W.J., 1997. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Applied and environmental microbiology* 63, 3412-3418.
- Volpato, G., Rodrigues, R.C., Fernandezlafuente, R., 2010. Use of enzymes in the production of semi-synthetic penicillins and cephalosporins: drawbacks and perspectives. *Current medicinal chemistry* 17, 3855-3873. (R)
- Weil, J., Miramonti, J., Ladisch, M.R., 1995. Cephalosporin-C - mode of action and biosynthetic-pathway. *Enzyme and microbial technology* 17, 85-87.
- Weissenburger, H. W. O., van der Hoeven, M. G., 1970. Efficient nonenzymatic conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid. *Recueil des travaux chimiques des pays-bas* 89, 1081-1084.
- Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., Deckwer, W.D., 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microbial cell factories* 5:36
- Youshko, M.I., van Langen, L.M., de Vroom, E., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K., 2002. Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: a new approach to optimization. *Biotechnology and bioengineering* 78, 589-593.
- Zhang, J.Y., Demain, A.L., 1990a. Purification from *Cephalosporium-acremonium* of the initial enzyme unique to the biosynthesis of penicillins and cephalosporins. *Biochemical and biophysical research communications* 169, 1145-1152.
- Zhang, J.Y., Demain, A.L., 1990b. Purification of ACV synthetase from *Streptomyces-clavuligerus*. *Biotechnology letters* 12, 649-654.
- Zhang, J.Y., Wolfe, S., Demain, A.L., 1992. Biochemical-studies on the activity of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces-clavuligerus*. *Biochemical journal* 283, 691-698.
- Zhang, M., Shi, M.L., Zhou, Z., Yang, S., Yuan, Z.Y., Ye, Q., 2006. Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. *Enzyme and microbial technology* 39, 555-560.
- Zhang, Q.J., Zu, W.X., 1993. Morphological, physiological and enzymatic characteristics of cephalosporin acylase-producing *Arthrobacter* strain-45-8A. *Archives of microbiology* 159, 392-395.